

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international



AL 2

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N 15/12, 15/63, 15/82 C07K 9/00, A61K 37/02	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 94/05787 (43) Date de publication internationale: 17 mars 1994 (17.03.94)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00853 (22) Date de dépôt international: 6 septembre 1993 (06.09.93) (30) Données relatives à la priorité: 92/10608 4 septembre 1992 (04.09.92) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cédex 16 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : BULET, Philippe [FR/FR]; 14, rue du Château-d'Eau, F-67550 Vendenheim (FR). HETRU, Charles [FR/FR]; 5, rue des Moines, F-67400 Illkirch-Grafenstaden (FR). DI-MARCQ, Jean-Luc [FR/FR]; 34, rue de Soultz, F-67000 Strasbourg (FR). HOFFMANN, Jules [FR/FR]; 5, rue Closener, F-67000 Strasbourg (FR). VAN DORSSE-LAER, Alain [FR/FR]; 8, rue de la Grossau, F-67000 Strasbourg (FR).		(74) Mandataires: PEAUCELLE, Chantal etc. ; Cabinet Armengaud Ainé, 3, avenue Bugeaud, F-75116 Paris (FR). (81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
(54) Title: GLYCOPEPTIDES, METHOD OF OBTAINING THEM AND BIOLOGICAL APPLICATIONS THEREOF (54) Titre: GLYCOPEPTIDES, LEUR PROCEDE D'OBTENTION, ET LEURS APPLICATIONS BIOLOGIQUES (57) Abstract Glycopeptides are disclosed having antibacterial properties due to an aminoacid sequence containing at least one aminoacid substituted by a glycosyl group selected from monosaccharides, amino sugars, polysaccharides and/or polyamino sugars. These glycopeptides can be used against bacteria. (57) Abrégé L'invention concerne des glycopeptides possédant des propriétés antibactériennes conférées par une séquence en acides aminés renfermant au moins un acide aminé substitué par un groupe glycosyle choisi parmi les oses, les osamines, les poly-oses et/ou -osamines. Ces glycopeptides sont utilisables dans la lutte contre les bactéries.		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NE	Niger
BE	Belgique	GN	Ginée	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NO	Norvège
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IE	Irlande	PL	Pologne
BR	Brazil	IT	Italie	PT	Portugal
BY	Bélarus	JP	Japon	RO	Roumanie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KR	République de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SE	Suède
CH	Suisse	LJ	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	République slovaque
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
CN	Chine	LV	Lettonie	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	MC	Monaco	TG	Togo
CZ	République tchèque	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DE	Allemagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
ES	Espagne			VN	Viet Nam
FI	Finlande				

GLYCOPEPTIDES, LEUR PROCEDE D'OBTENTION, ET LEURS
APPLICATIONS BIOLOGIQUES

5

L'invention a pour objet des glycopeptides, leur obtention, ainsi que leurs applications biologiques.

Elle vise plus particulièrement des glycopeptides
10 présentant notamment des propriétés antibactériennes.

On sait que des peptides antibactériens ont été isolés à partir d'insectes. Certaines espèces d'insectes présentent en effet une résistance efficace contre des bactéries. Des travaux récents ont établi que cette défense
15 est basée, pour une large part, sur la synthèse rapide (2 à 6 h) de plusieurs familles de peptides ou de polypeptides. Cette synthèse peut être induite, notamment, par une blessure septique ou, d'une manière générale, un traumatisme, ou par immunisation, c'est-à-dire par
20 injection d'une faible dose de bactéries.

Parmi les peptides ou polypeptides produits, on peut distinguer les quatre groupes suivants :

1) les cécropines qui sont des peptides cationiques de 4 kDa formant deux hélices α amphipathiques ; (ii) des
25 peptides cationiques riches en proline, de petite taille (2 à 4 kDa), partiellement caractérisés, comme les apidaecines et les abaecines ; (iii) plusieurs polypeptides distincts, ayant un poids moléculaire (PM) de 8 à 27 kDa, pour la plupart cationiques et fréquemment riches en résidus
30 glycine comme les attacines, les sarcotoxines II, les diptéricines et les coléoptéricines, et (iv) les défensines, peptides non glycosylés, modérément cationiques avec un pI de 8,0 à 8,5, comprenant de 38 à 43 acides aminés et contenant un motif caractéristique de 6 résidus
35 cystéine engagés dans 3 ponts disulfure intramoléculaires.

Les peptides antibactériens évoqués ci-dessus ont pu être induits chez des lépidoptères, des diptères, des hyménoptères et des coléoptères. Des travaux réalisés

jusqu'à présent sur d'autres espèces n'ont pas permis en revanche de détecter leur présence.

On remarquera qu'à ce jour la structure chimique attribuée à ces peptides correspondait à un simple enchaînement d'acides aminés.

Sur la base de cet enseignement, l'homme de l'art, cherchant à élaborer par voie de synthèse des peptides présentant de telles propriétés, n'était donc amené qu'à construire une séquence peptidique par enchaînement d'acides aminés déterminés selon les techniques classiques.

Or, dans le cadre de leurs travaux sur l'étude des bases moléculaires de la réponse immunitaire des insectes, les inventeurs ont constaté que l'activité antibactérienne de certains peptides inductibles chez des espèces particulières d'insectes était liée à la présence de groupes de substitution déterminés sur des acides aminés.

L'élimination de ces groupes conduit à une très forte réduction de l'activité antibactérienne, voire à sa disparition complète.

L'invention a donc pour but de fournir de nouveaux peptides substitués ayant un haut niveau d'activité vis-à-vis d'un grand nombre de bactéries.

Elle a de plus pour but de fournir des procédés d'obtention de tels peptides permettant de les obtenir en grande quantité.

L'invention vise en outre la mise à profit des propriétés biologiques conférées par les groupes de substitutions pour l'élaboration d'agents antibactériens utilisables en thérapeutique humaine et vétérinaire et, d'une manière générale, pour la lutte contre les bactéries.

Les peptides selon l'invention sont caractérisés en ce qu'ils possèdent des propriétés antibactériennes conférées par une séquence en acides aminés renfermant au moins un acide aminé - O - substitué par un groupe glycosyle contenant un ou plusieurs motifs ose et/ou osamine, un poly-ose et/ou-osamine.

L'acide aminé substitué est un acide aminé hydroxylé, tel que la thréonine, la sérine ou la tyrosine. La thréonine est particulièrement préférée.

Le groupe de substitution du ou des acides aminés sera désigné dans la description qui suit et les revendications par le terme "glycosyle", les peptides de l'invention étant également appelés glycopeptides.

Le groupe glycosyle est linéaire ou cyclique, substitué ou non, sous forme α ou β . Il comporte avantageusement des motifs ose et/ou osamine de 5 ou 6 atomes de carbone.

Comme groupes ose appropriés, on citera les pentoses, tels que le ribose, le lyxose, le xylose, l'arabinose, et les hexoses, tels que le galactose et le glucose, le fucose, le tallose, l'altrose, le gulose, le mannose et l'allose.

Des groupes osamine sont avantageusement constitués par un radical galactosamine, glucosamine, tallosamine, altrosamine, gulosamine, mannosamine, ou allosamine.

Les poly-oses et/ou -osamines comprennent un enchaînement des motifs oses et/ou osamines, notamment de 2 à 10 motifs, en particulier de 2 à 7 motifs.

Selon une variante de l'invention, le groupe glycosyle est substitué.

Les substituants des motifs ose et/ou osamine sont alors avantageusement choisis parmi des radicaux alkyle de 1 à 4 atomes de carbone ou, en particulier dans le cas des osamines, parmi les radicaux acyle, plus spécialement acétyle, ces radicaux substituant plus spécialement la fonction amine.

Ces substituants peuvent également correspondre à au moins un motif ose et/ou au moins un motif osamine. Le groupe glycosyle peut ainsi comprendre un motif osamine portant un ou plusieurs groupes alkyle et/ou acyle et également être substitué par un ou plusieurs motifs ose, notamment 2 ou 3.

Comme exemple de groupe glycosyle substitué, on citera un motif glucosamine ou galactosamine substitué par un ou

plusieurs motifs glucose et/ou galactose, en particulier un motif N-acyl-glucosamine ou N-acylgalactosamine, substitué par un ou plusieurs motifs glucose et/ou galactose, notamment 2 ou 3.

5 D'autres glycopeptides de l'invention comportent des substitutions plus complexes, concernant les parties N et/ou C terminales, et/ou des substitutions par des radicaux de l'acide sialique.

10 Comme le montrent les travaux des inventeurs rapportés dans les exemples, les groupes glycosyle évoqués, d'une manière surprenante, apparaissent indispensables pour disposer d'un niveau appréciable d'activité antibactérienne.

15 Les glycopeptides selon l'invention sont en outre caractérisés en ce qu'ils sont du type des glycopeptides tels qu'obtenus chez les arthropodes, et en particulier chez les larves ou les adultes d'insectes, par un procédé comprenant

20 - l'induction de leur synthèse notamment par injection aux insectes de bactéries en doses suffisantes, ou par blessure septique ou autre traumatisme,

- l'extraction de manière à recueillir les peptides ayant subi une glycosylation post-traductionnelle et, le cas échéant,

25 - le fractionnement de l'extrait isolé afin de séparer sélectivement les glycopeptides selon le niveau de leur activité antibactérienne.

Selon une variante, l'extraction est réalisée sur l'animal entier préalablement congelé, puis broyé.

30 Selon une autre variante, l'extraction est réalisée sur l'hémolymphe des animaux, et ce de manière classique, afin de séparer les peptides basiques.

L'invention vise les extraits correspondants, les mélanges de glycopeptides et les fractions.

35 Les glycopeptides de l'invention sont également caractérisés en ce qu'ils présentent une activité antibactérienne contre les germes à Gram négatif et à Gram positif.

Un groupe de glycopeptides tels que définis ci-dessus, est encore caractérisé en ce que leur séquence peptidique responsable de leur activité antibactérienne est contenue dans un domaine comportant au moins 30 % environ de groupes proline.

Cet enchaînement comporte plus spécialement un motif consensus de O-glycosylation proline-thréonine/sérine - Xaa1-Xaa2-proline dans lequel les motifs Xaa1 et Xaa2, identiques ou différents, sont des acides aminés variables.

L'enchaînement d'acides aminés de la séquence biologiquement active, c'est-à-dire présentant une activité antibactérienne, comporte, avantageusement, au moins un acide aminé hydrophobe tel que la thréonine, substitué par un groupe glycosyle.

Le groupe de substitution glycosyle est plus particulièrement constitué par un motif N-acylhexosamine, plus spécialement N-acétylgalactosamine ou N-acétylglucosamine, le cas échéant lui-même substitué par un ou plusieurs oses, notamment des pentoses et/ou des hexoses, comme le fucose et/ou le galactose et/ou le glucose.

Des glycopeptides préférés sont tels qu'inductibles chez les brachycères.

Un groupe de ces glycopeptides avantageux au regard de ses propriétés antibactériennes est tel qu'inductible chez la drosophile.

L'enchaînement des acides aminés des glycopeptides de ce groupe est notamment compris ou constitué par la séquence (I) suivante telle que déterminée selon la dégradation d'Edman :

cette séquence, et les séquences suivantes figurent dans la partie "Liste des séquences" donnée en fin de description avec les identifications SEQ ID n° 1 et suivantes.

Met Lys Phe Thr Ile Val Phe Leu Leu Leu

35 5 10

Ala Cys Val Phe Ala Met Ala Val Ala Thr

15 20

	Pro	Gly	Lys	Pro	Arg	Pro	Tyr	Ser	Pro	Arg
					25					30
	Pro	Thr	Ser	His	Pro	Arg	Pro	Ile	Arg	Val
					35					40
5	Arg	Arg	Glu	Ala	Leu	Ala	Ile	Glu	Asp	His
					45					50
	Leu	Ala	Gln	Ala	Ala	Ile	Arg	Pro	Pro	Pro
					55					60
	Ile	Leu	Pro	Ala						
10					64					

Plus particulièrement, ledit enchainement est compris ou constitué par la séquence (II) suivante (SEQ ID N° 2) en acides aminés.

	Gly	Lys	Pro	Arg	Pro	Tyr	Ser	Pro	Arg	Pro
15					5					10
	Thr	Ser	His	Pro	Arg	Pro	Ile	Arg	Val	
					15				19	

Cette séquence correspond à l'enchainement allant des positions 22 à 40 dans la séquence (I).

20 Dans ces glycopeptides préférés correspondant à ces séquences, les motifs thréonine ou sérine sont substitués, par un groupe glycosyle. On citera en particulier les glycopeptides dans lesquels le motif thréonine est substitué par un groupe N-acylhexosamine, tel que N-
 25 acétylglucosamine ou N-acétylgalactosamine, ce groupe comportant lui-même un ou plusieurs oses comme le fucose, le glucose ou le galactose.

D'autres glycopeptides préférés de l'invention, sont du type de ceux inductibles chez les diptères et, parmi
 30 ceux-ci, notamment chez *Phormia terranovae*.

De tels glycopeptides comprennent avantageusement ou sont constitués par un enchainement d'acides aminés, tel que déterminé selon la dégradation d'Edman, répondant à la séquence (III) suivante (SEQ ID N° 3) :

35	Asp	Glu	Lys	Pro	Lys	Leu	Ile	Leu	Pro	Thr
					5					10
	Pro	Ala	Pro	Pro	Asn	Leu	Pro	Gln	Leu	Val
					15					20

	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Asn	Arg	Lys	Asp	Gly
					25					30
	Phe	Gly	Val	Ser	Val	Asp	Ala	His	Gln	Lys
					35					40
5	Val	Trp	Thr	Ser	Asp	Asn	Gly	Gly	His	Ser
					45					50
	Ile	Gly	Val	Ser	Pro	Gly	Tyr	Ser	Gln	His
					55					60
	Leu	Pro	Gly	Pro	Tyr	Gly	Asn	Ser	Arg	Pro
10					65					70
	Asp	Tyr	Arg	Ile	Gly	Ala	Gly	Tyr	Ser	Tyr
					75					80

Asn Glu

82

15 en particulier à la séquence (IV) suivante (SEQ ID N° 4) :

	Asp	Glu	Lys	Pro	Lys	Leu	Ile	Leu	Pro	Thr
					5					10
	Pro	Ala	Pro	Pro	Asn	Leu	Pro	Gln	Leu	Val
20					15					20
	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Asn	Arg	Lys	Asp	Gly
					25					30
	Phe	Gly	Val	Ser	Val	Asp	Ala	His	Gln	Lys
					35					40
25	Val	Trp	Thr	Ser	Asp	Asn	Gly	Arg	His	Ser
					45					50
	Ile	Gly	Val	Thr	Pro	Gly	Tyr	Ser	Gln	His
					55					60
	Leu	Gly	Gly	Pro	Tyr	Gly	Asn	Ser	Arg	Pro
30					65					70
	Asp	Tyr	Arg	Ile	Gly	Ala	Gly	Tyr	Ser	Tyr
					75					80

Asn Phe

82

35 D'autres enchainements comportent comme partie N-terminale, au moins une partie de la séquence (V) suivante (SEQ ID N° 5) :

	Asp	Glu	Lys	Pro	Lys	Leu	Val	Leu	Pro	Ser
					5					10
	Xaa	Ala	Pro	Pro	Asn	Leu	Pro	Gln	Leu	Val
					15					20
5	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Asn	Asn	Lys	Xaa	Gly
					25					30
	Xaa	Xaa	Val	Ser	Ile	Asn	Ala	Ala	Gln	Lys
					35					40
	Val									
10	41									

en particulier de la séquence (VI) suivante (SEQ ID N° 6) :

	Asp	Glu	Lys	Pro	Lys	Leu	Val	Leu	Pro	Ser
					5					10
	Xaa	Ala	Pro	Pro	Asn	Leu	Pro	Gln	Leu	Val
15					15					20
	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Asn	Asn	Lys	Xaa	Gly
					25					30
	Xaa	Xaa	Val	Ser	Ile	Asn	Ala	His	Gln	Lys
					35					40
20	Val									
	41									

ou de la séquence (VII) suivante (SEQ ID N° 7) :

	Asp	Glu	Lys	Pro	Lys	Leu	Ile	Xaa	Pro	Xaa
					5					10
25	Xaa	Ala	Pro	Xaa	Asn	Leu	Xaa	Gln	Leu	Val
					15					20
	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Asn	Asn	Lys	Lys	Xaa
					25					30
	Xaa	Gly	Val	Xaa	Val	Xaa	Xaa	Ala	Gln	
30					35					39

D'autres séquences en acides aminés de peptides dotés de propriétés antibactériennes tels qu'inductibles chez *Phormia terranovae*, répondent à la séquence VIII suivante (SEQ ID N° 8) :

35	Asp	Glu	Lys	Pro	Lys	Leu	Ile	Leu	Pro	Thr
					5					10
	Pro	Ala	Pro	Pro	Asn	Leu	Pro	Gln	Leu	Val
					15					20

	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Asn	Arg	Lys	Asp	Gly
					25	er				30
	Phe	Gly	Val	Ser	Val	Asp	Ala	His	Gln	Lys
					35					40
5	Val	Trp	Thr	Ser	Asp	Asn	Gly	Arg	His	Ser
					45					50
	Ile	Gly	Val	Thr	Pro	Gly	Tyr	Ser	Gln	His
					55					60
	Leu	Gly	Gly	Pro	Tyr	Gly	Asn	Ser	Arg	Pro
10					65					70
	Asp	Tyr	Arg	Ile	Gly	Ala	Gly	Tyr	Ser	Tyr
					75					80
	Asn	Phe								
		82								

15 Dans les séquences (III) à (VIII), la thréonine ou la sérine en position 10 et/ou celle en position 54 est (sont) substituée(s) par un groupe glycosyle comme défini ci-dessus.

20 Le groupe glycosyle est avantageusement un motif osamine lui-même substitué par un ou plusieurs motifs ose. Un groupe glycosyle approprié pour disposer de glycopeptides antibactériens correspond à un groupe (N-acylhexosamine)-hexose, en particulier N-acétyl-galactosamine ou N-acétyl glucosamine, ce groupe étant lui-même substitué par un ou plusieurs motifs ose, en

25 particulier fucose et/ou galactose et/ou glucose.

D'autres glycopeptides préférés sont tels qu'inductibles chez les hyménoptères, notamment chez les abeilles.

30 D'autres glycopeptides encore sont du type de ceux inductibles chez les hémiptères, par exemple chez Pyrrhocoris apterus.

Des glycopeptides particulièrement préférés de ce type comprennent ou sont constitués par un enchaînement d'acides aminés, tel que déterminé selon la dégradation d'Edman, présentant la séquence (IX) suivante (SEQ ID N° 9) :

35

Val Asp Lys Gly Ser Tyr Leu Pro Arg Pro

Thr Pro Pro Arg Pro Ile Tyr Asn Arg Asn
15 20

Dans cette séquence, le motif thréonine en position 11 est substitué par un groupe glycosyle tel que défini ci-dessus.

L'invention vise également les fragments ou variantes des glycopeptides définis ci-dessus, dès lors que ces fragments ou ces variantes sont reconnus par des anticorps dirigés contre lesdits peptides et/ou possèdent des caractéristiques de charge et/ou d'hydrophobicité ou d'hydrophilie leur conférant une activité antibactérienne contre des germes à Gram négatif, telle qu'observée chez les glycopeptides natifs. Par variantes, on entend des glycopeptides dans lesquels un ou plusieurs acides aminés sont délétés, substitués par un groupe autre qu'un glycosyle, ou remplacés par un autre acide aminé de charge voisine.

Les caractéristiques d'hydrophilie et d'hydrophobicité des acides aminés sont données par Kyte et al dans J. Mol. Biol., 157, 105-132, 1982.

Les anticorps formés contre les glycopeptides et leurs fragments et variantes entrent également dans le champ de l'invention.

Selon un autre aspect, l'invention vise les séquences de nucléotides comportant l'information génétique correspondant aux acides aminés des glycopeptides définis ci-dessus.

Elle vise également les séquences de nucléotides capables de s'hybrider dans des conditions stringentes avec les séquences ci-dessus.

Par conditions stringentes, on entend les conditions définies dans l'ouvrage "Molecular Cloning" de Sambrook, Fritsch, Maniatis, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

L'invention vise en outre les séquences de nucléotides complémentaires de celles définies plus haut, ainsi que les ARN correspondants.

Les vecteurs d'expression et/ou de clonage comportant au moins un fragment des séquences de nucléotides définies ci-dessus font également partie de l'invention, ainsi que les hôtes transformés par ces vecteurs.

5 A titre d'exemples, des hôtes appropriés pour la mise en oeuvre de l'invention comprennent des bactéries, telles que *E.coli*, des levures ou encore des cellules d'arthropodes, de vertébrés ou de plantes.

10 L'invention concerne également les produits d'expression des vecteurs ci-dessus.

La structure chimique des glycopeptides à activité antibactérienne ayant été caractérisée comme indiqué ci-dessus, l'homme de l'art choisira aisément les techniques les plus appropriées pour leur élaboration.

15 En opérant par voie de synthèse, on a aisément accès aux structures des glycopeptides tels qu'inductibles chez les arthropodes et à leurs variantes.

On procède avantageusement à la substitution d'un ou de plusieurs des acides aminés de la séquence, avec un
20 groupe glycosyle, puis à l'introduction de groupes de blocage des fonctions à protéger et on forme une chaîne peptidique déterminée, avantageusement à l'aide d'un synthétiseur, le ou les acides aminés substitués étant introduits séquentiellement afin d'occuper la position
25 souhaitée dans la séquence. Les groupes de blocage sont éliminés en fin de synthèse.

En variante, on prépare le peptide avec une protection particulière pour l'acide aminé à substituer par le groupe glycosyle.

30 On procède ensuite à l'élimination du groupe protecteur de cet acide aminé uniquement, puis on introduit le groupe glycosyle protégé. Les groupes protecteurs des autres acides aminés et ceux du glycosyle sont alors éliminés.

35 Selon une variante, ces glycopeptides peuvent être obtenus selon les techniques du génie génétique en introduisant dans un vecteur approprié les séquences de nucléotides capables d'exprimer le squelette peptidique du

glycopeptide recherché, et en réalisant l'expression dans un hôte capable d'assurer une glycosylation post-traductionnelle. En variante, lorsque l'hôte utilisé ne peut assurer cette fonctionnalisation, on a recours aux
5 voies de synthèse chimiques.

Selon encore une autre variante, ces glycopeptides sont obtenus en immunisant des arthropodes renfermant des gènes capables de coder pour le ou les glycopeptide(s) recherché(s), notamment par injection de bactéries, en
10 quantité suffisante pour provoquer leur synthèse, ou par traumatisme, tel qu'une blessure septique. Quelques heures après l'immunisation, ou le traumatisme, les glycopeptides sont extraits puis fractionnés et la ou les fractions correspondant au(x) glycopeptide(s) recherché(s) isolée(s).

15 L'extraction est réalisée dans des conditions permettant d'éviter tout phénomène de dégradation des glycopeptides, tel qu'oxydation ou action de protéases.

Pour la purification des produits, on utilise avec avantage des supports très peu rétensifs et possédant un
20 pouvoir séparateur élevé. Des supports appropriés sont choisis parmi les supports utilisés en phase inverse.

La mise en oeuvre de ces dispositions permet d'isoler des glycopeptides, sous forme pure, à partir d'animaux aussi petits que des adultes de drosophile.

25 On notera de plus que cette technique d'extraction, telle que décrite dans les exemples, permet d'isoler des glycopeptides dont la fragilité est bien connue.

Les propriétés antibactériennes conférées aux peptides de l'invention par le groupe glycosyle ont été mises en
30 évidence dans des tests d'inhibition de croissance de bactéries à Gram négatif et de bactéries à Gram positif. A titre illustratif, des résultats sont donnés dans les exemples. Des cultures bactériennes pathogènes, comme les entérobactéries, effectuées à partir de prélèvements sur
35 des patients ont été mises ensuite en boîte gélosée. Le dépôt de glycopeptides selon l'invention sur ces bactéries a montré leur grande efficacité bactéricide. Ces propriétés sont mises à profit pour l'élaboration d'agents

antibactériens utilisables en thérapeutique humaine ou animale, ou pour traiter un environnement donné.

L'invention vise donc l'utilisation, pour élaborer des agents et compositions antibactériens, de peptides renfermant au moins un acide aminé - O - substitué par un
5 groupe contenant un ou plusieurs motifs oses et/ou osamine, un poly-ose et/ou -osamine, possédant une activité antibactérienne conférée par le ou les groupes de substitution glycosyle.

10 Ces compositions sont caractérisées en ce qu'elles renferment une quantité efficace des glycopeptides définis ci-dessus, en association avec un véhicule inerte approprié pour l'application envisagée.

Il est avantageux d'incorporer des excipients tels qu'inhibiteurs de protéases, antioxydants et inhibiteurs de
15 multiplication des bactéries.

Les compositions ou agents destinés à la thérapeutique humaine ou vétérinaire se présenteront avantageusement sous forme de solutions injectables, ou sous une forme pour
20 usage externe, telle que pommades, crèmes, poudres, ou solutions.

Ils sont particulièrement indiqués dans le cas de septicémies, ou encore pour le traitement des yeux, des oreilles, des soins buccaux et dentaires et en gynécologie.

25 On a recours avantageusement aux posologies habituelles dans ces domaines.

Les compositions de l'invention présentent également un grand intérêt en agrochimie comme agents phytosanitaires. Elles sont avantageusement utilisées sous
30 forme de poudres ou de solutions d'épandage.

L'utilisation des compositions et agents antibactériens de l'invention dans l'industrie agro-alimentaire permet d'empêcher la contamination par des germes à Gram négatif, pendant la fabrication de produits
35 et leur conservation.

L'invention vise également les génomes de plantes tels que modifiés par la présence de gènes codant pour les glycopeptides antibactériens définis ci-dessus. Ces

cellules végétales et plantes sont choisies parmi celles capables d'assurer la glycosylation des séquences peptidiques de manière à leur conférer une activité antibactérienne. On dispose ainsi de plantes résistant à des agents pathogènes.

A titre illustratif, on rapporte dans les exemples qui suivent d'autres caractéristiques et avantages de l'invention.

Dans ces exemples, il est fait référence aux figures 1 et 2 qui représentent respectivement

- la figure 1, la variation de l'absorbance en fonction du temps d'un peptide élué selon l'invention, et
- la figure 2, des séquences de nucléotides capables de coder pour un peptide de l'invention.

Exemple 1 : Obtention de glycopeptides antibactériens par extraction à partir de la drosophile.

- Méthode d'induction de la synthèse biologique.

Les drosophiles sont anesthésiées au gaz carbonique et immunisées par piqûre au niveau thoracique à proximité de l'insertion alaire à l'aide d'une aiguille plongée avant chaque inoculation dans une suspension bactérienne de Micrococcus luteus (Gram positif) et d'Escherichia coli 1106 (Gram négatif). Les insectes sont conservés à 25°C durant 24 heures et tués par congélation dans l'azote liquide.

- Extraction, fractionnement et purification des glycopeptides synthétisés :

* extraction

Les pattes, les ailes et les têtes d'adultes de drosophiles sont éliminées par tamisage, les thorax et les abdomens sont broyés en présence d'azote liquide durant 30 minutes dans un mortier maintenu au froid. A la poudre ainsi obtenue sont ajoutés 10 volumes d'eau acidifiée [0,1 % d'acide trifluoroacétique (TFA 0,1 %)] contenant de l'aprotinine (total de 2 mg). Après 30 minutes d'extraction sous agitation, l'extrait est centrifugé à 10.000 rpm pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant ainsi obtenu est

immédiatement soumis aux différentes étapes de la purification.

*Fractionnement de l'extrait sur cartouches Sep-Pak C18

5 Après dépôt de l'extrait sur un support de phase inverse, tel que commercialisé sous forme de cartouches sous la marque Sep-Pak C18^B, par Waters Millipore, les molécules à caractère hydrophile sont éliminées par un simple lavage par 5 ml d'eau acidifiée (TFA 0,05 %).
10 L'élution des molécules hydrophobes est réalisée avec des solutions de 10,40 et 80 % d'acétonitrile en eau acidifiée (TFA 0,05 %).

15 Les fractions recueillies sont dénommées "Elution 10 %", "Elution 40 %" et "Elution 80 %" et concentrées sous vide. Les fractions sont ensuite reconstituées avec de l'eau Milli Q avant l'analyse en HPLC.

*Purification par HPLC des molécules à activité antibactérienne.

a- Première étape de purification

20 La fraction "Elution 10 %" est analysée sur une colonne de phase inverse Aquapore OD 300 C18 R avec un gradient linéaire d'acétonitrile de 0 à 40 % dans l'eau acidifiée (TFA 0,05 %) en 90 minutes (soit une augmentation de 0,44 % d'acétonitrile par minute) pour un débit de 1
25 ml/min.

30 La fraction "Elution 40 %" est analysée sur la même colonne que la fraction "Elution 10 %". L'élution est réalisée dans un gradient linéaire d'acétonitrile de 2 à 52 % dans l'eau acidifiée (TFA 0,05 %) en 90 minutes (progression de 0,55 % d'acétonitrile par minute) à un débit de 1 ml/min.

35 La fraction "Elution 80 %" est analysée sur une colonne de phase inverse Aquapore RP 300 C8. L'élution est réalisée dans un gradient linéaire d'acétonitrile de 10 à 60 % dans l'eau acidifiée (TFA 0,05 %) en 90 minutes (soit une progression de 0,55 % d'acétonitrile par minute) pour un débit de 1 ml/min.

La collecte des fractions est réalisée suivant la variation de l'absorption à 225 nm, en tenant compte des épaulements. Chaque fraction ainsi récoltée est attribuable à un pic de densité optique.

5 Toutes les fractions sont évaporées à sec sous vide et reconstituées dans de l'eau Milli Q. L'activité antibactérienne de chaque fraction est détectée par la technique du test d'inhibition de croissance en milieu liquide sur des fractions aliquotes de 10 µl : une telle
10 fraction équivaut à un extrait de 300 adultes de drosophiles.

b- Purification finale

Deux étapes supplémentaires sont nécessaires à la purification finale des molécules à activité
15 antibactérienne. Les fractions "Elution 10 %" présentant l'activité biologique sont analysées sur une colonne de phase inverse Aquapore OD 300 C18 R. L'élution est réalisée dans un gradient linéaire d'acétonitrile de 0 à 20 % dans l'eau acidifiée (TFA 0,05 %) en 90 minutes (soit une
20 progression de 0,22 % d'acétonitrile par minute) pour un débit de 0,8 ml/min.

Les fractions qui présentent une activité antibactérienne, mesurée selon la méthode indiquée ci-après, sont purifiées sur la colonne précédemment décrite
25 dans un gradient linéaire d'acétonitrile de 0 à 20 % dans l'eau acidifiée (TFA 0,05 %) en 90 minutes pour un débit de 2 ml/min.

On rapporte sur la figure 1, la variation de la densité optique D₀ à 225 nm en fonction du temps lors de
30 l'étape de purification finale du glycopeptide. La ligne en pointillés correspond à l'acétonitrile (en %) ajouté pour la purification. La flèche en trait plein (↓) désigne le glycopeptide purifié et celle en pointillés (⇓) désigne le peptide de synthèse dont il sera question ci-après. La
35 colonne (||) représente l'activité antibactérienne.

La masse molaire mesurée est de 2564,4 daltons.

L'analyse de la microséquence est réalisée en procédant à une dégradation d'Edman automatisée du peptide

et à la détection des dérivés de phénylthiohydantoïne sur un séquenceur automatique à liquide pulsé (Applied Biosystems) modèle 473 A ou 477 A.

5 L'analyse des acides aminés est effectuée sur un analyseur 420 A (Applied Biosystems) avec analyseur HPLC et microordinateur.

10 Le peptide est hydrolysé à 120°C durant 24 heures avec HCl 6N en phase gazeuse (Pico-Tag, Millipore). On forme des dérivés avec le phényl isothiocyanate, puis on détecte les acides aminés à 254 nm.

15 Le peptide isolé et purifié correspond à la séquence (II) en acides aminés donnée plus haut et comporte un groupe de substitution N-acétylgalactosamine-galactose sur le motif thréonine, comme démontré par HPLC et spectrométrie de masse.

La mesure de l'activité biologique a été réalisée par la méthode suivante :

*Préparation des souches pour le test antibactérien

20 Pour chaque souche, une colonie isolée est prélevée et mise en suspension dans 30 ml de milieu PB (milieu LB dépourvu d'extrait de levure) et incubée à 30°C pendant une nuit sous agitation lente. Les bactéries en phase exponentielle de croissance sont ramenées par dilution dans du milieu PB frais à une concentration de 400.000
25 UFC(unités formant des colonies)/ml pour E.coli et 40.000 UFC/ml pour M.luteus (soit une $DO_{600}=0,001$).

*Réalisation du test antibactérien

30 L'échantillon à tester (10 µl) est déposé dans des puits de plaques de microtitration dans lesquels sont ajoutés 100 µl d'une culture bactérienne en phase exponentielle de croissance ramenée à $DO_{600} = 0,002$. Après 24 heures d'incubation à 25°C, la croissance bactérienne est mesurée à 600 nm. L'inhibition de croissance des bactéries, qui reflète l'activité antibactérienne, est mise
35 en évidence par la différence de DO_{600} existant entre les fractions testées et une culture témoin dans laquelle les 10 µl d'échantillon sont remplacés par 10 µl d'eau stérile.

Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau ci-après et sont exprimés en UFC/ml x 10³.

Temps d'incubation	1 min	1 h	3 h	5 h	24 h
Glycopeptide antibactérien	1088	1026	688	600	323
Expérience de contrôle	1220	1164	1200	1250	1088

Ces résultats mettent bien en évidence l'activité bactéricide des produits de l'invention.

A titre de comparaison, on a préparé par voie de synthèse en utilisant un synthétiseur de peptides tel que celui indiqué ci-dessus, un peptide présentant le squelette en acides aminés de l'enchaînement I, mais dans lequel la thréonine en position 11, contrairement au glycopeptide de l'invention, n'est pas glycosylé.

La séquence du peptide synthétique a été vérifiée en effectuant une dégradation d'Edman et en déterminant la masse molaire à l'aide d'un spectromètre de masse VG Biotech Bio Q.

On constate une élution différente du peptide en HPLC, comme le montre la figure 1.

La détermination de la masse molaire donne une valeur de 2199,6 daltons qui diffère de 364,8 daltons de celle du glypeptide de l'exemple 1.

De plus, ce peptide synthétique, dépourvu de groupement glycosyle, présente une activité biologique 10000 fois inférieure à celle du glycopeptide de l'exemple 1.

Afin de prouver que la différence entre le glycopeptide et ce peptide synthétique provient de la O-glycosylation sur la thréonine en position 11, le glycopeptide purifié de l'exemple 1 a été soumis à l'action de HF anhydre, qui hydrolyse spécifiquement les liaisons O-glycosyle.

Ce traitement a conduit principalement à un composé de 2199,6 daltons, donc de même masse que le peptide synthétique non substitué et à un composé de 2403,0 daltons. En revanche, le même traitement appliqué au peptide synthétique n'altère pas ce dernier dont la masse molaire reste inchangée.

Le groupe glycosyle est identifié comme étant un groupe N-acétylgalactosamine-galactose.

Exemple 2 : Séquences de nucléotides codant pour des glycopeptides antibactériens.

. Isolement de clones d'ADNc :

à l'aide d'une sonde dégénérée 5' TAG GGN CGN GGC TTG CC 3' et à partir de 30 000 phages contenant l'insert correspondant, on procède au criblage d'une banque d'ADNc de drosophile (l'élaboration de cette banque est rapportée ci-après).

On obtient 30 clones d'hybridation positifs.

. Séquençage

Dix de ces clones sont séquencés. On constate que les inserts contiennent tous un cadre ouvert de lecture de 65 codons commençant avec une méthionine. Les inserts 1 à 9 ne montrent pas de variation de séquence. Le plus long est représenté sur la figure 2 (SEQ ID N° 10). L'insert 10 (SEQ ID N° 11) montre des variations de bases qui sont représentées sur la figure 2. Le signal consensus de polyadénylation AATAAA est indiqué en caractères gras. La première ligne de la séquence de nucléotides correspond à celles des clones 1 à 9, la deuxième ligne mentionne les bases différentes du clone 10, les autres bases étant identiques à celles données sur la première ligne ne sont pas indiquées.

La séquence en acides aminés déduite correspond à un précurseur de la séquence peptidique du glycopeptide de l'exemple 1 et présente l'enchaînement I donné ci-dessus. Cet enchaînement I comporte la séquence II de 19 acides aminés et dans la partie N-terminale un signal peptidique potentiel (motifs 1 à 19) et un dipeptide Thr-Pro (en positions 20 et 21). La partie C-terminale comprend un

peptide de 22 acides aminés (occupant les positions 43 à 64 dans l'enchaînement I) séparé de l'enchaînement II par un site de clivage dibasique Arg-Arg (en positions 41 et 42).

. Préparation de la banque d'ADNc

5 On prépare une banque d'ADNc de taille sélectionnée en soumettant à un challenge bactérien des larves de drosophile au troisième stade larvaire. L'ARN enrichi en poly (A) est extrait comme décrit par Reichhart et al dans EMBO J. 11, 1469-1477 (1992). Une banque à gt 22 est
10 construite en utilisant le système Superscript lambda commercialisé par Gibco BRL. Les ADNc sont sous-clonés dans Mt3mp19. Les deux brins sont séquencés en utilisant la méthode au didéoxy de Sanger avec le kit de séquençage commercialisé sous la marque Séquanase R par USB.

15 Exemple 3 : Obtention de glycopeptides antibactériens par expression chez Saccharomices cerevisiae.

En opérant selon les techniques classiques du génie génétique, on insère dans un vecteur une séquence de nucléotides d'un clone d'ADNc de l'exemple 2 et on réalise
20 l'expression chez Saccharomices cerevisiae.

Le glycopeptide produit est récupéré et analysé pour vérifier sa séquence.

Exemple 4 : Obtention par voie de synthèse de glycopeptides antibactériens du type de ceux induits chez
25 Phormia terranova.

On fait réagir une thréonine avec une N-acétylgalactosamine. On procède au blocage des groupes hydroxyle de la galactosamine à l'aide de groupes protecteurs utilisés habituellement à cet effet. On utilise
30 par exemple du chlorure de benzoyle pour protéger les groupes hydroxyle avec un radical benzoyle.

L'enchaînement d'acides aminés de la séquence VI donnée plus haut est réalisé à l'aide d'un synthétiseur de peptides, tel qu'utilisé dans l'exemple 1.

35 L'analyse par spectrométrie de masse du produit obtenu et la dégradation d'Edman permettent de vérifier que le glycopeptide recherché a bien été synthétisé.

Exemple 5 : Obtention de glycopeptides antibactériens par extraction à partir de Phormia terranovae.

- Induction de la synthèse biologique.

Des larves de troisième stade de Phormia terranovae sont blessées par piqûre à l'aide d'une aiguille plongée préalablement dans une suspension bactérienne, par exemple d'Enterobacter-cloacae.

- Extraction, fractionnement et purification des glycopeptides synthétisés.

Après 24 heures, le sang est prélevé par incision de la cuticule et soumis à centrifugation à 36000 g, pendant 20 min, à 4°C.

Le surnageant est additionné d'acide acétique et chauffé à 100°C, pendant 4 min. Les protéines précipitées sont éliminées par centrifugation et le surnageant est appliqué sur une colonne échangeuse de cations, équilibrée avec un tampon d'acétate d'ammonium 40 à 500 mM.

On vérifie l'activité biologique des peptides obtenus en opérant comme décrit dans l'exemple 1, par exemple en étudiant l'activité vis-à-vis de E.coli. Les peptides actifs obtenus sont filtrés sur cartouche Sep Pack C18 Waters^R et purifiés en chromatographie liquide, HPLC phase inverse sur une colonne Baker-Bond C18 WPR. L'élution est effectuée selon un gradient linéaire avec de l'acétonitrile.

On soumet l'un des peptides actifs fraîchement isolé à la dégradation d'Edman et on détermine sa masse moléculaire.

La séquence en acides aminés obtenue répond à la séquence (VIII) donnée plus haut, sa masse moléculaire est de 9440,4 (± 3). Les résidus thréonine en positions 10 et 54 sont O-glycosylés. Cette O-glycosylation correspond sur chacune de ces positions à un groupe N-acétyl hexosamine-hexose. En particulier, les résidus thréonine sont substitués par des groupes N-acétylgalactosamine-galactose-glucose. Par traitement avec de l'acide fluorhydrique HFA, on observe une diminution de la masse moléculaire à 8692,6 et une perte de l'activité biologique.

Comme pour le peptide de l'exemple 1, on notera avec intérêt que la O-glycosylation est nécessaire pour l'activité biologique des peptides.

5 Ces substitutions peuvent être plus complexes que celles déjà indiquées correspondant à un groupe N-acétyl-hexamine-hexose. En effet, les extractions des peptides actifs ont été réalisées en milieu acide et peuvent donc conduire à une altération de la chaîne de substitution.

10 En opérant dans des conditions plus douces, il est alors possible d'obtenir des peptides actifs comportant un groupe glycosyle substitué en outre par exemple par un radical de l'acide sialique et/ou un fucose.

Exemple 6 : Obtention de glycopeptides antibactériens à partir de Pyrrhocoris apterus.

15 - Immunisation et obtention de l'hémolymph.

On recueille les adultes de P. apterus durant l'été sur des feuilles d'hibiscus. On injecte à 1000 insectes une suspension de 2 µl contenant 2500 cellules de M. luteus (bactéries à Gram positif) et 2500 cellules de E. coli (bactéries à Gram négatif).

20 A différents intervalles de temps, on recueille l'hémolymph (environ 3 µl/insecte) en sectionnant une antenne et en pressant doucement le corps de l'insecte. Les hémolymphes sont rassemblées et placées dans un puits en plastique pré-refroidi en présence d'aprotinine (Sigma A-62-79, concentration finale : 10 µg/ml d'hémolymph) comme inhibiteur de protéases, et de phénylthiourée (concentration finale : 1 µg/ml d'hémolymph) comme inhibiteur de mélanisation. L'hémolymph est centrifugée à 30 13000 g pendant 1 heure à 4°C.

On observe une forte activité anti-bactérienne dans les 24 heures suivant l'injection. Cette activité est maintenue jusqu'à 72 heures. Le volume total d'hémolymph collectée est de 2,2 ml.

35 Après l'élimination des cellules sanguines par centrifugation, on applique les surnageants, comme indiqué dans les exemples ci-dessus, sur une cartouche Sep-Pak C18R.

L'activité antibactérienne est récupérée par élution avec 50 % d'acétonitrile dans de l'eau acidifiée (0,05 % TFA).

5 Les fractions actives sont rassemblées et appliquées sur une colonne HPLC d'exclusion de taille, puis on effectue une élution isocratique avec 30 % d'acétonitrile dans de l'eau acidifiée (0,03 % de TFA).

10 Les activités antibactériennes des fractions sont vérifiées en dosant des quantités aliquotes et en effectuant des tests d'inhibition de croissance sur plaques vis-à-vis de différents micro-organismes. Une activité anti-*E.coli* est détectée dans la fraction 1 correspondant à des masses moléculaires de 10 à 30 kDa, et une activité antibactérienne dirigée contre *E.coli* et *M.luteus*, dans la
15 fraction 2 avec des masses moléculaires inférieures à 10 kDa.

La fraction 1 est ensuite soumise à une HPLC C18 en phase inverse et les molécules actives sont d'abord éluées avec un gradient variant de 2 à 52 % d'acétonitrile dans de
20 l'eau acidifiée (90 min, débit 1 ml/min). On effectue une nouvelle chromatographie sur la même colonne avec un gradient plus faible de 15 à 35 % d'acétonitrile dans de l'eau acidifiée (pendant 90 min) avec un débit plus fort (2 ml/min). On récupère un produit apparaissant pur, appelé
25 peptide A.

La fraction 2 est soumise également à une chromatographie HPLC C18 en phase inverse avec un gradient de 2 à 52 % d'acétonitrile dans de l'eau acidifiée (0,05 % de TFA).

30 Deux zones présentant une activité anti-bactérienne sont récupérées : l'une correspond à un peptide, appelé peptide B, présentant une activité anti-*M.luteus* et la deuxième à un peptide appelé peptide C, qui est actif vis-à-vis de *E.coli*.

35 Le peptide C apparaît constitué par un mélange de composés et est soumis à une purification supplémentaire à l'aide de deux processus successifs de chromatographie (HPLC, gradient de 10 à 30 %, suivi d'un gradient de 5 à

25 % d'acétonitrile dans de l'eau acidifiée, 0,05 % de TFA, 90 min pour chaque gradient). On obtient ainsi le peptide C sous forme pure

- Détermination de la structure primaire du peptide C.

5 On soumet le peptide C à la réaction de dégradation d'Edman.

La détermination de la séquence en acides aminés montre que le peptide C comporte 20 résidus et correspond à l'enchaînement IX donné ci-dessus. La mesure par spectrométrie de masse de la masse moléculaire conduit à
10 une valeur de $m/z = 2543,3$.

Les signaux observés pour le résidu en position 11 sont analogues à ceux observés pour le résidu thréonine du peptide selon l'exemple 1, tel qu'induit chez la
15 drosophile.

La différence entre la masse calculée du peptide (2340,2 Da) et la masse expérimentale (2543,3 Da) est de 203,1 Da, ce qui correspond à un motif N-acétylhexosamine (221,18 Da) avec une molécule d'eau nécessaire pour la
20 liaison glycan. Le groupe de substitution du motif thréonine est un groupe N-acétylgalactosamine.

Exemple 7 : Formulation utilisable pour traiter des septicémies à entérobactéries.

25 1) Peptide de l'exemple 1 : 10 à 100 mg

Excipient : eau physiologique.

2) Peptide de l'exemple 6 : 10 à 100 mg

Excipient : eau physiologique.

La formulation est administrée par voie injectable 4 fois par jour, pendant une semaine.

30 Dans ces essais, aussi bien que dans les nombreuses autres expériences réalisées selon l'invention, on constate l'effet bactéricide puissant et rapide des peptides de l'invention qui permet un traitement efficace des septicémies.

LISTE DES SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

- 5 (i) DEPOSANT:
 (A) NOM: CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
 SCIENTIFIQUE (C N R S)
 (B) RUE: 3 rue Michel Ange
 (C) VILLE: PARIS
 10 (E) PAYS: FRANCE
 (F) CODE POSTAL: 75794 CEDEX 16
- (ii) TITRE DE L' INVENTION :
 GLYCOPEPTIDES, LEUR PROCEDE D'OBTENTION,
 15 ET LEURS APPLICATIONS BIOLOGIQUES
- (iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 11
- 20 (iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:
 (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
 (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
 (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
 25 (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0,
 Version #1.25 (OEB)
- (v) DONNEES DE LA DEMANDE ACTUELLE:
 NUMERO DE DEPOT: PCT/FR (en attente)

30

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°: 1:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 35 (A) LONGUEUR: 64 acides aminés
 (B) TYPE: acide aminé
 (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: Peptide
- 40 (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:
 (A) NOM/CLE: Peptide
 (B) EMPLACEMENT: 1..64
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID N°: 1:
 45
- | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Lys | Phe | Thr | Ile | Val | Phe | Leu | Leu | Leu |
| | | | | 5 | | | | | 10 |
| Ala | Cys | Val | Phe | Ala | Met | Ala | Val | Ala | Thr |
| | | | | 15 | | | | | 20 |
| 50 | Pro | Gly | Lys | Pro | Arg | Pro | Tyr | Ser | Pro |
| | | | | 25 | | | | | 30 |

26

	Pro	Thr	Ser	His	Pro	Arg	Pro	Ile	Arg	Val
					35					40
	Arg	Arg	Glu	Ala	Leu	Ala	Ile	Glu	Asp	His
					45					50
5	Leu	Ala	Gln	Ala	Ala	Ile	Arg	Pro	Pro	Pro
					55					60
	Ile	Leu	Pro	Ala						
				64						

10 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°: 2 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 19 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

15 (ii) TYPE DE MOLECULE: Peptide

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

(A) NOM/CLE: Peptide

20 (B) EMBLACEMENT: 1..19

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID N° 2:

	Gly	Lys	Pro	Arg	Pro	Tyr	Ser	Pro	Arg	Pro
					5					10
25	Thr	Ser	His	Pro	Arg	Pro	Ile	Arg	Val	
					15				19	

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°: 3 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 82 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

35 (ii) TYPE DE MOLECULE: Peptide

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

(A) NOM/CLE: Peptide

(B) EMBLACEMENT: 1..82

40 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID N° 3 :

	Asp	Glu	Lys	Pro	Lys	Leu	Ile	Leu	Pro	Thr
					5					10
	Pro	Ala	Pro	Pro	Asn	Leu	Pro	Gln	Leu	Val
45					15					20
	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Asn	Arg	Lys	Asp	Gly
					25					30

	Phe	Gly	Val	Ser	Val	Asp	Ala	His	Gln	Lys
					35					40
	Val	Trp	Thr	Ser	Asp	Asn	Gly	Gly	His	Ser
					45					50
5	Ile	Gly	Val	Ser	Pro	Gly	Tyr	Ser	Gln	His
					55					60
	Leu	Pro	Gly	Pro	Tyr	Gly	Asn	Ser	Arg	Pro
					65					70
	Asp	Tyr	Arg	Ile	Gly	Ala	Gly	Tyr	Ser	Tyr
10					75					80
	Asn	Glu								
		82								

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°: 4 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 82 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Peptide

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

(A) NOM/CLE: Peptide

(B) EMBLACEMENT: 1..82

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID N° 4:

	Asp	Glu	Lys	Pro	Lys	Leu	Ile	Leu	Pro	Thr
					5					10
	Pro	Ala	Pro	Pro	Asn	Leu	Pro	Gln	Leu	Val
30					15					20
	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Asn	Arg	Lys	Asp	Gly
					25					30
	Phe	Gly	Val	Ser	Val	Asp	Ala	His	Gln	Lys
					35					40
35	Val	Trp	Thr	Ser	Asp	Asn	Gly	Arg	His	Ser
					45					50
	Ile	Gly	Val	Thr	Pro	Gly	Tyr	Ser	Gln	His
					55					60
	Leu	Gly	Gly	Pro	Tyr	Gly	Asn	Ser	Arg	Pro
40					65					70
	Asp	Tyr	Arg	Ile	Gly	Ala	Gly	Tyr	Ser	Tyr
					75					80

Asn Phe

82

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°: 5 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 41 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Peptide

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

(A) NOM/CLE: Peptide

(B) EMLACEMENT: 1..41

(C) AUTRES INFORMATIONS : Xaa signifie acide aminé variable

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID N° 5 :

Asp	Glu	Lys	Pro	Lys	Leu	Val	Leu	Pro	Ser
				5					10
Xaa	Ala	Pro	Pro	Asn	Leu	Pro	Gln	Leu	Val
				15					20
Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Asn	Asn	Lys	Xaa	Gly
				25					30
Xaa	Xaa	Val	Ser	Ile	Asn	Ala	Ala	Gln	Lys
				35					40
Val									
41									

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°: 6 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 41 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Peptide

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

(A) NOM/CLE: Peptide

(B) EMLACEMENT: 1..41

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID N° 6 :

Asp	Glu	Lys	Pro	Lys	Leu	Val	Leu	Pro	Ser
				5					10
Xaa	Ala	Pro	Pro	Asn	Leu	Pro	Gln	Leu	Val
				15					20
Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Asn	Asn	Lys	Xaa	Gly
				25					30

Xaa Xaa Val Ser Ile Asn Ala His Gln Lys
35 40

Val

41

5

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°: 7 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 39 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

10

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Peptide

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

15

(A) NOM/CLE: Peptide

(B) EMBLACEMENT: 1..39

(C) AUTRES INFORMATIONS : Xaa signifie acide
aminé variable

20

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID N° 7 :

Asp Glu Lys Pro Lys Leu Ile Xaa Pro Xaa
5 10

Xaa Ala Pro Xaa Asn Leu Xaa Gln Leu Val
15 20

25

Gly Gly Gly Gly Gly Asn Asn Lys Lys Xaa
25 30

Xaa Gly Val Xaa Val Xaa Xaa Ala Gln
35 39

30

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°: 8 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 82 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

35

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Peptide

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

40

(A) NOM/CLE: Peptide

(B) EMBLACEMENT: 1..82

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID N° 8 :

Asp Glu Lys Pro Lys Leu Ile Leu Pro Thr
5 10

45

Pro Ala Pro Pro Asn Leu Pro Gln Leu Val
15 20

30

	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Asn	Arg	Lys	Asp	Gly
					25					30
	Phe	Gly	Val	Ser	Val	Asp	Ala	His	Gln	Lys
					35					40
5	Val	Trp	Thr	Ser	Asp	Asn	Gly	Arg	His	Ser
					45					50
	Ile	Gly	Val	Thr	Pro	Gly	Tyr	Ser	Gln	His
					55					60
	Leu	Gly	Gly	Pro	Tyr	Gly	Asn	Ser	Arg	Pro
10					65					70
	Asp	Tyr	Arg	Ile	Gly	Ala	Gly	Tyr	Ser	Tyr
					75					80
	Asn	Phe								
		82								

15

- (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°: 9 :
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 20 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

20

(ii) TYPE DE MOLECULE: Peptide

25

- (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:
- (A) NOM/CLE: Peptide
- (B) EMBLACEMENT: 1..20

30

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID N° 9 :

Val	Asp	Lys	Gly	Ser	Tyr	Leu	Pro	Arg	Pro
				5					10
Thr	Pro	Pro	Arg	Pro	Ile	Tyr	Asn	Arg	Asn
				15					20

35

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°: 10 :

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 353 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : double brin
- (D) CONFIGURATION: linéaire

40

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARN génomique

45

- (iii) HYPOTHETIQUE : oui
- (iv) ANTI-SENS : non

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

(A) NOM/CLE:

(B) EMBLACEMENT: 1..353

5

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID N° 10

	TCCACCACTC CAAGCACA ATG AAG TTC ACC ATC GTT TTC CTG	42
	Met Lys Phe Thr Ile Val Phe Leu	
	-20 -15	
10	CTG CTT GCC TGC GTT TTT GCC ATG GCT GTG GCC ACT CCC	81
	Leu Leu Ala Cys Val Phe Ala Met Ala Val Ala Thr Pro	
	-10 -5	
	GGC AAG CCA CGC CCC TAC AGC CCA CGC CCC ACC TCC CAT	120
	Gly Lys Pro Arg Pro Tyr Ser Pro Arg Pro Thr Ser His	
15	1 5 10	
	CCT CGC CCC ATT CGA GTG AGG CGC GAG GCA CTG GCC ATC	159
	Pro Arg Pro Ile Arg Val Arg Arg Glu Ala Leu Ala Ile	
	15 20 25	
	GAG GAT CAC CTG GCT CAA GCT GCC ATC AGG CCA CCA CCC	198
20	Glu Asp His Leu Ala Gln Ala Ala Ile Arg Pro Pro Pro	
	30 35	
	ATT CTG CCC GCC TAA AGA TGTGTGCATA CCGCGGAGAA	236
	Ile Leu Pro Ala	
	40	
25	GTCATCCGAT CAAATTTGTT TTGAAAAATC TTTATAAAAA	276
	TTGTGAATTT TTTACTTTCT GCAAACAGTA AACAATAAAC	316
	ACACGAAAGA CAGCAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAA	353

30 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°: 11 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 363 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS : double brin

35

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARN génomique

(iii) HYPOTHETIQUE : oui

(iv) ANTI-SENS : non

40

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

(A) NOM/CLE:

(B) EMBLACEMENT: 1..363

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID N° 11		
	ATTTG TCCACCACTC CAAGCACA ATG AAG TTC ACC ATC GTT	41
	Met Lys Phe Thr Ile Val	
5	-20	
	TTC CTG CTG CTT GCT TGC GTT TTT GCC ATG GGT GTG GCC	80
	Phe Leu Leu Leu Ala Cys Val Phe Ala Met Gly Val Ala	
	-15 -10 -5	
	ACT CCC GGC AAG CCA CGC CCC TAC AGC CCA CGC CCC ACC	119
10	Thr Pro Gly Lys Pro Arg Pro Tyr Ser Pro Arg Pro Thr	
	1 5 10	
	TCC CAT CCC CGC CCC ATT CGA GTG AGG CGC GAG GCA CTG	158
	Ser His Pro Arg Pro Ile Arg Val Arg Arg Glu Ala Leu	
	15 20	
15	GCC ATC GAG GAT CAC CTG ACT CAA GCT GCC ATC AGG CCA	197
	Ala Ile Glu Asp His Leu Thr Gln Ala Ala Ile Arg Pro	
	25 30 35	
	CCA CCC ATT CTG CCC GCC TAA AGA TGTGTGCATA	231
	Pro Pro Ile Leu Pro Ala	
20	40	
	CCGCGGAGAA GTCATCCGAT CAAATTTGTT TTGAAAAATC	271
	TTTATAAAAA TTGTGAATTT TTTACTTTCT GCAAACAGTA	311
	AGCAATAAAC ACACGAAAGA CAGCAAAAAA AAAAAAAAAA	351
	AAAAAAAAAA AA	363
25		

REVENDEICATIONS

5 1/ Glycopeptides, caractérisés en ce qu'ils possèdent des propriétés antibactériennes conférées par une séquence en acides aminés renfermant au moins un acide aminé O - substitué par un groupe glycosyle contenant un ou plusieurs motifs, ose et/ou osamine, un poly-ose et/ou -osamine.

10 2/ Glycopeptides selon la revendication 1, caractérisés en ce que l'acide aminé substitué est un acide aminé hydroxylé tel que la thréonine, la sérine ou la tyrosine.

15 3/ Glycopeptides selon la revendication 1 ou 2, caractérisés en ce que le groupe glycosyle est linéaire ou cyclique, substitué ou non, sous forme α ou β , comportant avantageusement 5 ou 6 atomes de carbone, les substituants éventuellement présents étant choisis notamment parmi les radicaux alkyle de 1 à 4 atomes de carbone ou, en particulier, pour les osamines, parmi les radicaux acyle, plus spécialement acétyle.

20 4/ Glycopeptides selon la revendication 3, caractérisés en ce que le groupe glycosyle est choisi parmi les hexoses tels que le galactose, le glucose, le tallose, l'altrose, le gulose, le mannose et l'allose, les hexosamines telles que la galactosamine, la glucosamine, la tallosamine, l'altrösamine, le gulosamine, la mannosamine ou l'allosamine, ou les hexosamines substituées par un ou plusieurs motifs hexoses comme la (N-acétylhexosamine)-hexose(s).

30 5/ Glycopeptides selon la revendication 4, caractérisés en ce que le groupe glycosyle est une N-acétylglucosamine ou une N-acétylgalactosamine, substituée par un galactose ou un motif galactose-glucose.

35 6/ Glycopeptides selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisés en ce qu'ils sont du type des peptides tels qu'obtenus chez les arthropodes, et notamment chez les larves ou les adultes d'insectes par un procédé comprenant

- l'induction de leur synthèse notamment par injection de bactéries en doses suffisantes ou par blessure septique ou autre traumatisme,

5 - l'extraction de manière à recueillir les peptides ayant subi une glycosylation post-traductionnelle et, le cas échéant,

- le fractionnement de l'extrait isolé afin de séparer sélectivement les glycopeptides selon le niveau de leur activité antibactérienne.

10 7/ Glycopeptides, selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisés en ce qu'ils présentent une activité contre les germes à Gram négatif et à Gram positif.

15 8/ Glycopeptides selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisés en ce que leur séquence peptidique responsable de leur activité antibactérienne, qui comprend au moins un acide aminé substitué comme défini dans la revendication 1, est contenue dans un domaine comportant au moins 30 % environ de groupes proline.

20 9/ Glycopeptides selon la revendication 8, caractérisés en ce que ladite séquence comporte au moins un motif de O-glycosylation proline-thréonine/sérine-Xaa1-Xaa2-proline dans lequel les motifs Xaa1 et Xaa2, identiques ou différents, sont des acides aminés variables.

25 10/ Glycopeptides selon la revendication 8 ou 9, caractérisés en ce que ladite séquence comporte au moins un acide aminé hydrophobe tel que la thréonine, substitué par un groupe glycosyle, en particulier par un groupe N-acétylhexosamine ou (N-acétylhexosamine)-hexose.

30 11/ Glycopeptides selon l'une des revendications 1 à 10, tels qu'inductibles chez la drosophile.

35 12/ Glycopeptides selon la revendication 11, caractérisés en ce qu'ils comportent ou qu'ils sont constitués par les séquences (I) ou (II), dans lesquelles au moins un motif thréonine ou sérine est -O - substitué comme défini dans l'une des revendications 3 à 5.

13/ Glycopeptides selon l'une des revendications 1 à 10, tels qu'inductibles chez les diptères, notamment chez Phormia terranova.

14/ Glycopeptides selon la revendication 13
caractérisés en ce qu'ils comportent ou qu'ils sont
constitués par une séquence en acides aminés, telle que
déterminée selon la dégradation d'Edman, répondant à l'une
5 des séquences (III) à (VIII), dans lesquelles la thréonine
ou la sérine en position 10 et/ou celle en position 54,
sont substituée(s) par un groupe glycosyle comme défini
dans l'une des revendications 3 à 5.

15/ Glycopeptides selon l'une des revendications 1 à
10, tels qu'inductibles chez les hyménoptères, notamment
chez les abeilles.

16/ Glycopeptides selon l'une des revendications 1 à
10, caractérisés en ce qu'ils sont tels qu'inductibles chez
les hémiptères, par exemple chez Pyrrhocoris apterus.

17/ Glycopeptides selon la revendication 16,
caractérisés en ce qu'ils comportent ou qu'ils sont
constitués par la séquence (IX).

18/ Les fragments, mutants et dérivés fonctionnels des
glycopeptides selon l'une des revendications 1 à 17.

19/ Séquences de nucléotides comportant l'information
génétique correspondant aux acides aminés des glycopeptides
selon l'une des revendications 1 à 18, les séquences
capables de s'hybrider avec celles-ci dans des conditions
stringentes, les séquences complémentaires et les ARN
correspondants.

20/ Vecteurs d'expression et/ou de clonage comportant
au moins un fragment des séquences de nucléotides selon la
revendication 19 et hôtes transformés par ces vecteurs.

21/ Les produits d'expression des vecteurs selon la
revendication 20.

22/ Procédé d'obtention de glycopeptides selon l'une
des revendications 1 à 18, caractérisé en ce qu'on procède
à l'enchaînement des acides aminés par voie de synthèse,
l'un au moins des acides aminés utilisés étant O -
substitué comme défini dans la revendication 1 et étant
introduit de manière à occuper la position souhaitée dans
la séquence.

23/ Agents antibactériens caractérisés en ce qu'ils renferment au moins un glycopeptide selon l'une des revendications 1 à 18.

5 24/ Compositions antibactériennes, caractérisées en ce qu'elles renferment une quantité efficace de glycopeptides selon l'une des revendications 1 à 18, en association avec un véhicule inerte.

10 25/ Compositions selon la revendication 24, caractérisées en ce qu'elles sont utilisées en thérapeutique humaine ou vétérinaire, le véhicule inerte étant approprié pour cette utilisation.

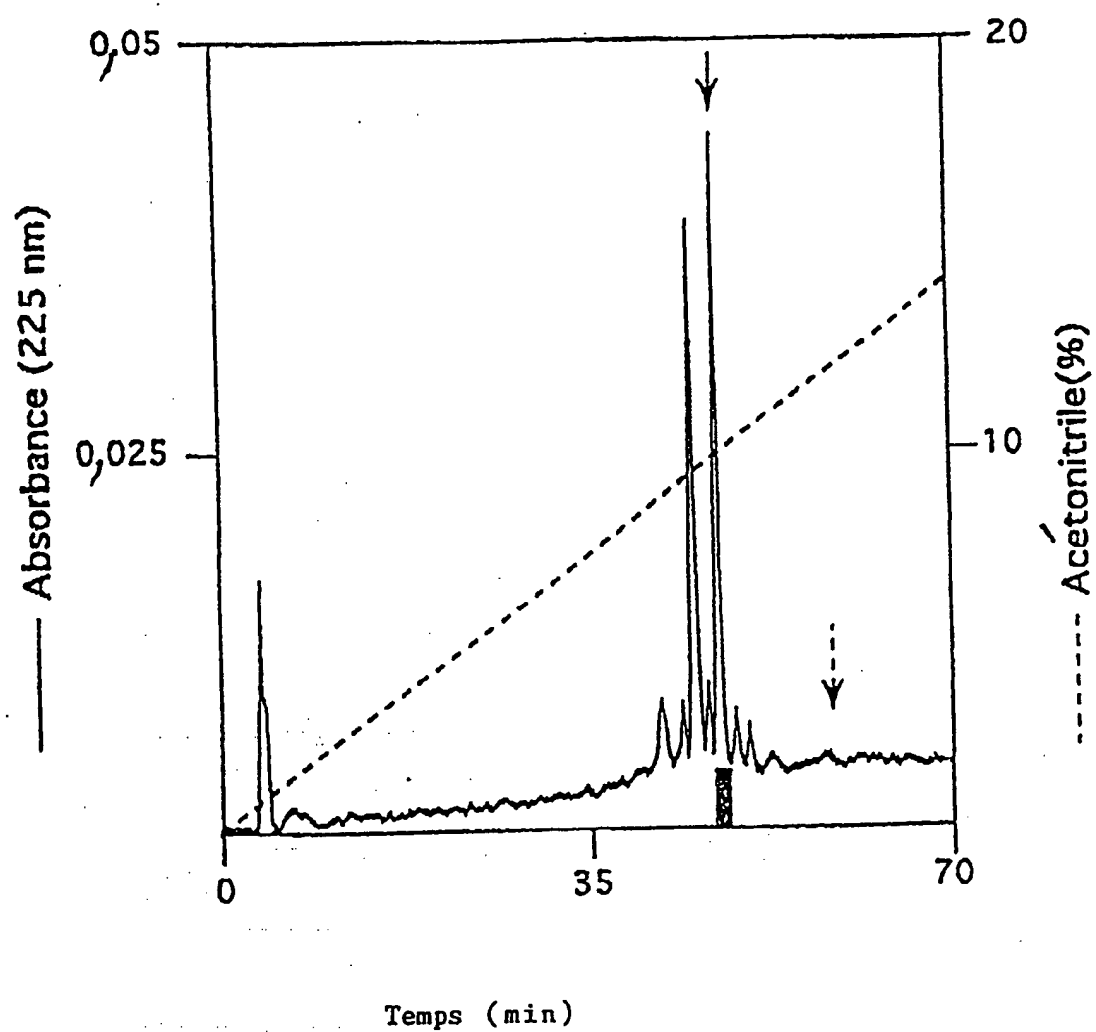
26/ Compositions selon la revendication 24, caractérisées en ce qu'elles sont utilisées en agrochimie, le véhicule inerte étant approprié pour cette utilisation.

15 27/ Compositions selon la revendication 24, caractérisées en ce qu'elles sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire.

20 28/ Cellules végétales et plantes dont le génome est modifié par la présence de gènes capables de coder pour les séquences peptidiques des glycopeptides selon l'une des revendications 1 à 18, ces cellules végétales et plantes étant capables d'assurer la glycosylation des séquences peptidiques de manière à leur conférer une activité antibactérienne.

1/2

FIGURE 1



2/2

FIGURE 2

```

TCCACCACCTCCGAGCACA ATG AAG TTC ACC ATC GTT TTC CTG CTG CTT GCC TGC
ATTG.....
Met Lys Phe Thr Ile Val Phe Leu Leu Ala Cys
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
GTT TTT GCC ATG GCT GTG GCC ACT CCC GGC AAG CCA CGC CCC TAC AGC CCA CGC
.....G.....
Val Phe Ala Met Ala Val Ala Thr Pro Gly Lys Pro Arg Pro Tyr Ser Pro Arg
Gly
13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30
CCC ACC TCC CAT CCT CGC CCC ATT CGA GTG AAG CGC GAG GCA CTG GCC ATC GAG
.....C.....
Pro Thr Ser His Pro Arg Pro Ile Arg Val Arg Arg Glu Ala Leu Ala Ile Glu
31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48
GAT CAC CTG GCT CAA GCT GCC ATC AGG CCA CCA CCC ATT CTG CCC GCC TAA AGA
.....A.....
Asp His Leu Ala Gln Ala Ala Ile Arg Pro Pro Pro Ile Leu Pro Ala End
Thr
49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65
TGTGTGCATACCGGAGAGTCATCCGATCAAAATTGTTTGGAAAAATCTTTATATAAATGTGNAATTT
.....
TTACTTTCTGCAACAGTAACCAATAAACACACGAAAGACAGCAAAAAAATAAAAAAATAAAAAA
.....G.....AAAAA

```


INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. onal Application No

PCT/FR 93/00853

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 5 C12N15/12 C12N15/63 C12N15/82 C07K9/00 A61K37/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5 C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 7, no. 34 (C-150)(1179) 10 February 1983 & JP,A,57 188 525 (OTSUKA SEIYAKU K.K.) 19 November 1982 see abstract --- -/--	1,7,23

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "B" earlier document but published on or after the international filing date
- "I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 December 1993

Date of mailing of the international search report

23-12-1993

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2220 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Montero Lopez, B.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No

PCT/FR 93/00853

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY vol. 204, no. 1, February 1992 pages 147 - 153 NORHIKO NAKAKURA ET AL. 'Isolation and structural determination of three peptides from the insect locusta migratoria' see abstract see page 147, right column, paragraph 3 - page 148, left column, paragraph 1 see page 148, left column, paragraph 4 -paragraph 5 see page 149, right column, last paragraph; figure 2 see page 152, right column, paragraph 3 see page 152, right column, last paragraph ---	1-6
A	EP,A,0 348 892 (MITSUI TOATSU CHEMICALS, INCORPORATED) 3 January 1990 see page 3, line 23 - page 4, line 1 ---	1,3,4
A	WO,A,89 09786 (SANDOZ AG) 19 October 1989 see page 1, paragraph 1 -paragraph 3 see page 3, paragraph 2 -paragraph 3 see page 11, paragraph 3 -last paragraph; examples 5-7,10,11 -----	1,3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Int. Application No

PCT/FR 93/00853

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0348892	03-01-90	JP-A- 2009898	12-01-90
		AU-B- 617487	28-11-91
		AU-A- 3705689	04-01-90
		US-A- 4963653	16-10-90

WO-A-8909786	19-10-89	AU-A- 3263789	12-10-89
		AU-A- 3362889	03-11-89
		BE-A- 1004357	10-11-92
		CH-A- 682152	30-07-93
		FR-A- 2629825	13-10-89
		GB-A- 2218102	08-11-89
		GB-A- 2246782	12-02-92
		JP-A- 1305099	08-12-89
		LU-A- 87495	14-11-89
		NL-A- 8900864	01-11-89
		SE-A- 8901241	02-02-90
		FR-A- 2682680	23-04-93

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem Internationale No
PCT/FR 93/00853

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 5 C12N15/12 C12N15/63 C12N15/82 C07K9/00 A61K37/02

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 5 C07K C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 7, no. 34 (C-150)(1179) 10 Février 1983 & JP,A,57 188 525 (OTSUKA SEIYAKU K.K.) 19 Novembre 1982 voir abrégé</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	1,7,23

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"A" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

22 Décembre 1993

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

23 -12- 1993

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 631 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Montero Lopez, B

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den c Internationale No
PCT/FR 93/00853

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY vol. 204, no. 1 , Février 1992 pages 147 - 153 NORIIKO NAKAKURA ET AL. 'Isolation and structural determination of three peptides from the insect locusta migratoria' voir abrégé voir page 147, colonne de droite, alinéa 3 - page 148, colonne de gauche, alinéa 1 voir page 148, colonne de gauche, alinéa 4 -alinéa 5 voir page 149, colonne de droite, dernier alinéa ; figure 2 voir page 152, colonne de droite, alinéa 3 voir page 152, colonne de droite, dernier alinéa</p>	1-6
A	<p>EP,A,0 348 892 (MITSUI TOATSU CHEMICALS, INCORPORATED) 3 Janvier 1990 voir page 3, ligne 23 - page 4, ligne 1</p>	1,3,4
A	<p>WO,A,89 09786 (SANDOZ AG) 19 Octobre 1989 voir page 1, alinéa 1 -alinéa 3 voir page 3, alinéa 2 -alinéa 3 voir page 11, alinéa 3 -dernier alinéa ; exemples 5-7,10,11</p>	1,3

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Den. : Internationale No

PCT/FR 93/00853

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
EP-A-0348892	03-01-90	JP-A-	2009898	12-01-90
		AU-B-	617487	28-11-91
		AU-A-	3705689	04-01-90
		US-A-	4963653	16-10-90

WO-A-8909786	19-10-89	AU-A-	3263789	12-10-89
		AU-A-	3362889	03-11-89
		BE-A-	1004357	10-11-92
		CH-A-	682152	30-07-93
		FR-A-	2629825	13-10-89
		GB-A-	2218102	08-11-89
		GB-A-	2246782	12-02-92
		JP-A-	1305099	08-12-89
		LU-A-	87495	14-11-89
		NL-A-	8900864	01-11-89
		SE-A-	8901241	02-02-90
		FR-A-	2682680	23-04-93
